

# Microcystis aeruginosa の群体形成を誘因する糖生成に 及ぼすレクチン添加の影響

東北大学大学院 学生会員 瀧澤翔太  
東北大学大学院 正会員 真砂佳史  
山形大学 正会員 伊藤紘晃  
東北大学大学院 フェロー会員 大村達夫

## 1. はじめに

夏のダムや湖などの閉鎖性水域では、富栄養化の影響によりアオコが発生する。アオコの主な構成藻類である *Microcystis aeruginosa* は自然水中では莢膜で囲まれた群体の形で存在している。莢膜の成分の多くは糖質が占めており、糖質の中でもグルコース、キシロース、構造内にウロン酸を含むガラクトース、グルクロースの割合が高い (雨宮ら, 1986)。藻類由来以外の他の微生物の莢膜には、ウロン酸のような酸性糖はほとんど見られない (Decho ら, 1992)。

自然水中とは異なり実験室培養では *M. aeruginosa* の群体は形成されないとされている (Robert ら, 2005)。自然水中と実験室培養の条件の違いは様々考えられるが、その 1 つとして、種々の糖質を架橋する性質を持つレクチンが *M. aeruginosa* の群体形成に影響を与える可能性がある。本研究では 3 種類のレクチン (peanut agglutinin: PNA, ConcanavalinA: Con A, wheat germ agglutinin: WGA) を MA 培地に添加したときの *M. aeruginosa* の様子を顕微鏡観察し、細胞の放出する有機物を莢膜を含む細胞表面有機物 (surface organic matter: SOM)、細胞内有機物 (inner organic matter: IOM)、細胞外有機物 (extracellular organic matter: EOM) の三種類の有機物中のウロン酸生産量の測定を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 細胞の培養方法

供試藻類には国立環境研究所より分与された *M. aeruginosa* NIES 843 株を用いた。培養には MA 培地を

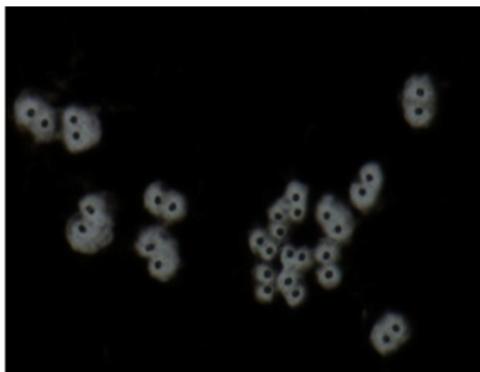


図 1.a 培養一週間目の細胞の様子 (con A) b 死滅した細胞を植え継いで一週間の細胞の様子

用いて、温度 30 °C、照度 4000 Lux、12 h 明暗の条件で行った。PNA, Con, WGA を 5 $\mu$ g/L で添加したものとレクチン非添加で培養した細胞を、トリプリケートして培養を行う。5 週目まで 1 週間おきに細胞の生産した SOM, EOM, IOM のウロン酸を測定し、単位細胞あたりの生産量の測定を行う。植継ぎ時の細胞数 250cell/ $\mu$ L として培養を行う。

### 2.2 EOM, SOM, IOM の回収方法

藻類の入った遠心管を遠心分離 (10000rpm, 10 分) し上清をメンブレンフィルター (Millipore, 孔径 0.45  $\mu$ m, 直径 25mm) で濾過する。この濾液を EOM①、濾過されずにフィルター上にとどまったものを EOM②とする。上清を取り除いた遠心管に超純水を加えボルテックスで攪拌することでペレット状になっていた細胞を再懸濁。一日後、再び遠心分離を行い、上清を濾過することによって濾液を回収する。上清を取り除いた遠心管に添加量を加えたのち密閉式超音波細胞破碎装置 (UCW-201, COSMOBIO) で超音波によって細胞を破碎し、この液体を濾過することによって IOM を回収する。

### 2.3 培地中の中性糖、酸性糖の測定

濃縮・回収した各増殖時期の濾液濃縮試料を用いてウロン酸はカルバズール硫酸法 (Dubois ら, 1956) によりウロン酸を測定した。細胞密度は血球計算板を用いて測定した。

### 2.4 死滅した細胞の植継ぎ

培養二ヶ月以上経過した細胞の植継ぎを行い、一週間置きに細胞の観察を行った。

## 3. 実験結果

### 3.1 群体の形成について

図 1.a は培養 1 週目の細胞を墨汁染色後に顕微鏡観察したものである。いくつかの細胞が白く見える莢膜に囲まれて存在している様子が観察された。しかし 2 週目以降は莢膜に囲まれた細胞を発見することはできなかった。

### 3.2 細胞のウロン酸生産

図 2a, b, c は培養 1-5 週目までに細胞が生産したウロン酸総量を試料採取時点の細胞数で割った値であ

キーワード *M. aeruginosa*, 莢膜, 群体, ウロン酸

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 masago@water.civil.tohoku.ac.jp TEL 022-795-7483

る。細胞あたりのウロン算生成量はこの値より大きい  
が、ウロン酸生成量の目安として使用した。SOMに含  
まれるウロン酸の量は1週目が最も多く、それ以降減  
少していった。逆にIOMおよびEOM②のウロン酸量は  
日数の経過とともに増加した。レクチンの有無および  
種類によるウロン算生産量には差が見られなかった。

### 3.3 カルバゾール硫酸法とEOM

EOM①にカルバゾール硫酸法を施すと本来ウロン酸  
が示すはずの赤紫色にならず、緑色に呈色した。MA培  
地にカルバゾール硫酸法を適用したところ緑色を呈色  
したことから、EOM試料が緑色に染まったのはMA培  
地が原因であると判断し、EOM①のウロン酸測定は行  
わなかった。細胞の入った培養液にカルバゾール硫酸  
法を適用したところ、時間の経過と共に緑色が薄くな  
り、5週目で本来示すはずの赤紫色を呈色したことから、  
MA培地中の栄養塩が4~5週間で使い切られたと考え  
られる。

### 4. 考察

2週目以降細胞が莢膜に囲まれている様子が観察で  
きななかったことはSOM中の糖量が減少するという傾向  
が示している。細胞が莢膜を形成する理由として、紫  
外線や外敵などの影響を防ぐためや、貧栄養下で生存  
するためであるという案が示されている(雨宮ら、  
1984: Rogerら, 1989)。本研究では培養開始1週間後  
に莢膜を形成したが、本研究の実験条件は上に示した2  
条件のどちらにもあてはまらない。藻類による莢膜生  
成条件やその目的については今後さらに検討が必要で  
ある。

#### 参考文献

雨宮由美子, 中山大樹, 藍藻 *Microcystis* より単離した  
粘質鞘物質の化学的性質と金属類に対する吸着特性,  
日本陸水学会雑誌, 45, 187-193, 1984.  
Decho, A. W., Moriarty, D. J. W., Bacterial exopolymer  
utilization by a Harpacticoid copepod - A methodology and  
results, *Limnol. Oceanogr.* 35, 039-1049, 1990.  
Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A.,  
Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars  
and related substances, *Anal. Chem.* 28, 350-356, 1956.  
Roberto D. P., Cecilia F., Claudio S., Massimo V.: Population  
of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms  
in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea,  
*Sci. of the Total Environ.*, Vol. 353, pp.360-368, 2005.  
Roger, Y. S., John, L. I., Mark, L. W., Page, R. P., : 微生物  
学 [上], 培風館, 1989.

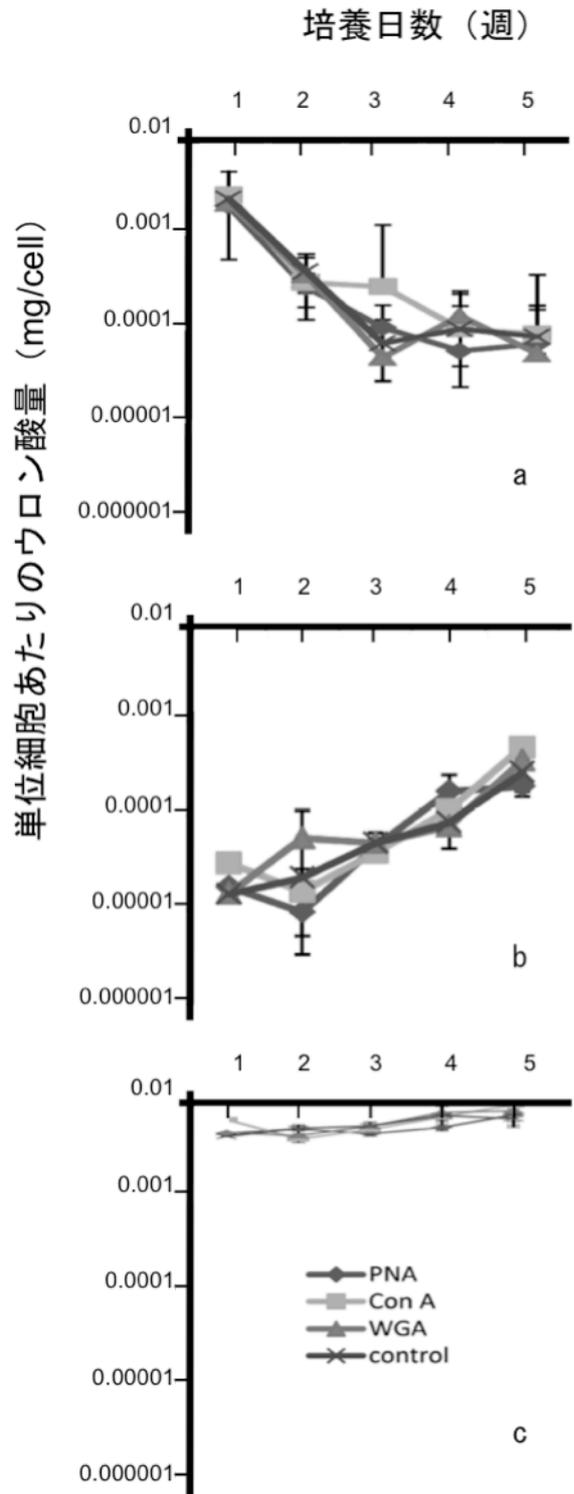


図 2. 単位細胞あたりのウロン酸生産量 a.SOM, b.IOM, c.EOM②